



TITLE:

Molecular breeding and biochemical
characterization of an oleaginous fungus
Mortierella alpina for prostaglandin F2 α
production(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Mohd, Fazli Bin Farida Asras

CITATION:

Mohd, Fazli Bin Farida Asras. Molecular breeding and biochemical characterization of an oleaginous fungus *Mortierella alpina* for prostaglandin F2 α production. 京都大学, 2019, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2019-03-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k21821>

RIGHT:

許諾条件により本文は2020-03-24に公開

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	Mohd Fazli Bin Farida Asras
論文題目	Molecular breeding and biochemical characterization of an oleaginous fungus <i>Mortierella alpina</i> for prostaglandin F _{2α} production (プロスタグランジンF _{2α} の生産に向けた油糧糸状菌 <i>Mortierella alpina</i> の分子育種と生化学的解析)		
(論文内容の要旨)			
<p>プロスタグランジンはアラキドン酸、ジホモ-γ-リノレン酸、エイコサペンタエン酸などの炭素数20の高度不飽和脂肪酸から誘導される脂質オートコイドである。アラキドン酸から誘導されるプロスタグランジンの一種プロスタグランジンF_{2α} (PGF_{2α}) は、平滑筋収縮作用を示し、妊娠末期における陣痛誘発・陣痛促進・分娩促進を目的に医薬品として利用されている。畜産分野でも、繁殖に活用されている。現在PGF_{2α}は化学合成にて生産されている。優れた合成法ではあるが、複雑な多段工程からなる製造法であるため、生産を効率化しうる代替製造法の開発が求められている。</p> <p>本論文では、PGF_{2α}の生物生産法の開発を目指し、PGF_{2α}の生合成前駆体であるアラキドン酸の高生産菌<i>Mortierella alpina</i>の分子育種に取り組んだ。PGF_{2α}の生合成において重要な酵素シクロオキシゲナーゼ (COX) は、アラキドン酸からプロスタグランジンG₂ (PGG₂) を経てプロスタグランジンH₂ (PGH₂) を生成する2段階の反応を触媒する。PGH₂はPGF_{2α}シンターゼの作用によりPGF_{2α}へと変換される。本論文では、<i>M. alpina</i>でのCOX発現によるPGF_{2α}生産の可能性を検証するとともに、PGF_{2α}高生産にむけたCOX高発現株の分子育種と生産条件の最適化に取り組み、PGF_{2α}発酵生産の基盤を確立した。</p> <p>第一章では、<i>M. alpina</i>でのCOX発現によるPGF_{2α}生産の可能性を検証した。<i>M. alpina</i> 1S-4株はアラキドン酸高含有油脂の実用生産菌であり、PGF_{2α}生産が確認されている。しかし、そのPGF_{2α}生合成経路は不明であり、生産量もごく微量であった。<i>M. alpina</i> 1S-4株を宿主としてPGF_{2α}生合成の鍵酵素であるCOXを発現することで、本菌のPGF_{2α}生産能を顕在化することを試みた。COX遺伝子としては、紅藻オゴノリ (<i>Gracilaria vermiculophylla</i>) 由来のCOX遺伝子GvCOXを選抜した。</p> <p><i>M. alpina</i> 1S-4由来の構成発現プロモーターhis550にてGvCOXの発現を制御するバイナリーベクターを構築し、それを<i>Agrobacterium tumefaciens</i>媒介形質転換法によって<i>M. alpina</i> 1S-4に導入した。形質転換株GvMA#28株におけるCOXの機能発現を休止菌体を用いたアラキドン酸変換にて確認したところ、PGF_{2α}の生成を認めた。すなわち、<i>G. vermiculophylla</i>由来GvCOXによるアラキドン酸のPGG₂、PGH₂への変換と、引き続く<i>M. alpina</i> 1S-4内在性PGF_{2α}生合成酵素群によるPGG₂、PGH₂の変換により、PGF_{2α}の生産が可能となることが見いだされた。続いて、GvMA#28株の培養中におけるPGF_{2α}生産を検証したところ、ウラシル含有GY培地（グルコース：2% (w/v)、酵母エキス：1% (w/v)、ウラシル：50 mg/L) における28℃、12日間の振とう培養により、菌体内に0.8 μg/g、菌体外培養液中に6.4 μg/mLのPGF_{2α}が蓄積することを確認した。生成したPGF_{2α}の大部分は菌体外培養液中に蓄積しており、COX発現GvMA#28株によるPGF_{2α}の菌体外発酵生産が可能であることが示された。</p> <p>第二章では、COX発現GvMA#28株の分子育種によるPGF_{2α}高生産株の構築を試みた。最初にGvCOXの高発現を目指し、his550プロモーターを<i>M. alpina</i> 1S-4由来の高発現プロモーターSSA2に置換した形質転換株の構築を試みた。高発現プロモーターSSA2にてGvCOXの発現を制御するバイナリーベクターを構築し、それを<i>A. tumefaciens</i>媒介形質転換法によって<i>M. alpina</i> 1S-4に導入した。得られたCOX高発現SSA2#23株は、</p>			

GvMA#28株の約2倍のPGF_{2α}生産性を示した。続いて、SSA2#23株に対し紫外線照射による変異導入を行い、得られた変異株ライブラリーからPGF_{2α}生産がさらに約2倍向上したSSA2#23-UV#7株を選抜した。また、*M. alpina* 1S-4由来高発現プロモーター $pp3$ にてGvCOXの発現を制御しカルボキシン耐性遺伝子をマーカーとするベクターをパーティクルガン法にてSSA2#23-UV#7株に導入し、PGF_{2α}高生産株CB#1を構築した。CB#1は、GY培地（グルコース：2%（w/v）、酵母エキス：1%（w/v））における28℃、10日間の振とう培養により、菌体外培養液中に30 μg/mLのPGF_{2α}を蓄積した。

第三章では、CB#1株の培養条件の最適化によるPGF_{2α}生産の向上を試みた。検討した項目（温度、pH、振とう速度、前培養条件、初期植菌量、培地組成など）の中で顕著な生産向上効果をもたらしたのは、培地に添加するグルコースの濃度とその添加法、ならびに、哺乳類COXにおいて活性化剤として報告されていた各種遊離脂肪酸の培地への添加であった。培地に添加するグルコースの最適初期濃度は2%（w/v）であり、培養5日目もしくは7日目でのグルコース（2%（w/v））の逐次添加がさらに効果的であった。また、COX活性化を期待して添加した遊離脂肪酸のうち、ステアリン酸、オレイン酸に顕著な効果が見られた。CB#1は、最適培養条件下（オレイン酸添加GY培地（グルコース：2%（w/v）、酵母エキス：1%（w/v）、オレイン酸：10 μg/mL）における28℃、10日間の振とう培養）において、菌体外培養液中に290 μg/mLのPGF_{2α}を蓄積した。

以上のように本論文は、アラキドン酸高含有油脂生産菌*M. alpina*での紅藻*G. vermiculophylla*由来COXの発現、引き続く分子育種によるCOX高発現株の構築、ならびに、培養条件の最適化により、PGF_{2α}の効率的発酵生産法の構築を達成し、PGF_{2α}の生物生産法の基盤を確立した。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

炭素数20の高度不飽和脂肪酸であるアラキドン酸から誘導されるプロスタグランジン $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) は、平滑筋収縮作用を示すことから陣痛促進剤などとして医薬品用途に利用されている。現在、その生産は化学合成にて行われているが、複雑な多段工程からなるため、生産法の効率化が求められている。本論文は、代替製造法としての生物生産法の開発を試みたものであり、 $PGF_{2\alpha}$ の生合成前駆体であるアラキドン酸の高生産菌*Mortierella alpina*の分子育種、生産条件の最適化を行ったものである。評価すべき点として、以下の3点があげられる。

1. アラキドン酸高含有油脂の実用生産菌*M. alpina* 1S-4株を宿主として、 $PGF_{2\alpha}$ 生合成の鍵酵素であるCOXの発現による $PGF_{2\alpha}$ 生産を試みた。紅藻*Gracilaria vermiculophylla*由来のCOX遺伝子を*M. alpina* 1S-4株に導入した形質転換株GvMA#28において、*G. vermiculophylla*由来COXと*M. alpina* 1S-4内在性 $PGF_{2\alpha}$ 生合成酵素群との協働により $PGF_{2\alpha}$ が生産され、主に菌体外培養液中に蓄積することを見だし、 $PGF_{2\alpha}$ の発酵生産が可能であることを示した。
2. COX発現GvMA#28株の分子育種による $PGF_{2\alpha}$ 高生産株の構築を試み、*M. alpina* 1S-4由来高発現プロモーターによるCOX高発現、紫外線照射による変異導入により、 $PGF_{2\alpha}$ 高生産株CB#1を構築した。CB#1は、GY培地（グルコース：2% (w/v)、酵母エキス：1% (w/v)）における28℃、10日間の振とう培養により、菌体外培養液中に30 $\mu\text{g/mL}$ の $PGF_{2\alpha}$ を蓄積した。
3. CB#1株の培養条件の最適化による $PGF_{2\alpha}$ 生産の向上を試み、培地に添加するグルコースの濃度とその添加法、ならびに、哺乳類COXにおいて活性化剤として報告されていた遊離脂肪酸の培地への添加が効果的であることを見出した。CB#1は、最適培養条件下（オレイン酸添加GY培地（グルコース：2% (w/v)、酵母エキス：1% (w/v)、オレイン酸：10 $\mu\text{g/mL}$ ）における28℃、10日間の振とう培養）において、菌体外培養液中に290 $\mu\text{g/mL}$ の $PGF_{2\alpha}$ を蓄積した。

以上のように、本論文は、アラキドン酸高含有油脂生産菌*M. alpina*での紅藻*G. vermiculophylla*由来COXの発現、引き続く分子育種によるCOX高発現株の構築、ならびに、培養条件の最適化により、 $PGF_{2\alpha}$ の効率的発酵生産法の構築を達成し、 $PGF_{2\alpha}$ の生物生産法の基盤を確立したものであり、発酵生理学、分子微生物科学、応用生化学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成31年2月8日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）